

BEST AVAILABLE COPY

①⑨ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift

⑩ DE 44 34 551 A 1

⑤① Int. Cl.<sup>8</sup>:

C 07 K 14/635

⑳ Aktenzeichen: P 44 34 551.8

㉑ Anmeldetag: 28. 9. 94

㉒ Offenlegungstag: 4. 4. 96

DE 44 34 551 A 1

㉗ Anmelder:

Forssmann, Wolf-Georg, Prof. Dr.Dr., 30175  
Hannover, DE

㉘ Vertreter:

Godemeyer, T., Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 51491 Overath

㉚ Erfinder:

Adermann, Knut, Dr., 30177 Hannover, DE;  
Forssmann, Wolf-Georg, Prof. Dr.Dr., 30175  
Hannover, DE; Hock, Dieter, Dr., 74924  
Neckarbischofsheim, DE; Mägerlein, Markus, 63785  
Obernburg, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37)

⑤⑦ Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37), enthaltend  $\alpha$ -helicale Aminosäuresequenzbereiche und/oder nicht strukturierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die Peptide bei Injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind ein Diagnostikum und Antikörper erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den erfindungsgemäßen Peptiden.

DE 44 34 551 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 02. 96 602 014/30

8/28

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37), ein Diagnostikum erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den Peptiden, Antikörper oder deren Fragmente erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den Peptiden sowie die Verwendung der Peptide zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktiven h-PTH.

Humanes Parathormon (hPTH), ein lineares Polypeptid aus 84 Aminosäuren, spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Calciumstoffwechsels. Der Metabolismus dieses Hormons führt zu einer großen Zahl C-terminaler Fragmente, deren biologische Funktion noch nicht geklärt ist. Als zirkulierendes N-terminales Fragment ist das hPTH 1-37 festgelegt (EP-A 0 349 545). Dieses Fragment besitzt die volle biologische Aktivität des Gesamthormons. Diese nimmt allerdings bei Verlust der ersten Aminosäure, Serin, deutlich ab und geht ohne die ersten beiden Aminosäuren, Serin und Valin, völlig verloren.

Für das intakte Hormon hPTH 1-84 und für N-terminales Fragment werden Serumkonzentrationen im Bereich von 10-12 mol/L gemessen. Zur Bestimmung solch niedriger Konzentrationen bedient man sich immunologischer Meßverfahren. Die validesten Ergebnisse liefern hierbei Meßverfahren nach dem Doppelantikörper oder Sandwich Prinzip (z. B. Two-site Radioimmunometric Assay, IRMA oder Sandwich Enzym Linked Immuno Sorbent Assay, Sandwich ELISA). Solche Assays sind für hPTH 1-84 kommerziell erhältlich. Zur Messung von hPTH 1-34 ist ein Assay nach dem Doppelantikörper-Prinzip nicht bekannt.

Hierfür sind zwei Antikörper notwendig. Diese müssen, um eine gegenseitige sterische Hinderung zu vermeiden, Epitope des Antigens erkennen, die in ausreichender Entfernung zueinander liegen. Bei Immunisierung mit dem intakten Antigen erhält man ein heterogenes Gemisch unterschiedlicher Antikörper, die für einen Sandwich-Assay erst aufwendig gereinigt werden müssen. Zwar war es bisher möglich aufgrund theoretischer Berechnungen nach B.A. Jameson & H. Wolf, The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants, CABIOS 4, p 181-186, 1988 am N-Terminus eine bevorzugte immunogen wirkende Sequenz im Bereich der Aminosäuren 7-14 festzustellen. Eine Immunisierung mit N-terminalen Fragmenten nach etablierten Methoden führt in erster Linie zu Antikörpern, die, wie für hPTH 1-34 beschrieben (J. Tampe, P. Brozio, H.E. Manneck, A. Mißbichler, E. Blind, K.B. Müller, H. Schmidt-Gayk und F.P. Armbruster; Characterisation of antibodies against human N-terminal parathyroid hormone by epitope mapping; J. Immunoassay 13 S. 1-13, 1992), in dem Bereich dieser Aminosäuren binden. Diese Antikörper können aber nicht zwischen biologisch aktiven und biologisch inaktiven PTH 1-84 oder Fragmenten davon, denen die ersten beiden Aminosäuren Serin und Valin fehlen, unterscheiden.

Das der Erfindung zugrunde liegende technische Problem besteht darin, Peptide anzugeben, mit deren Hilfe die oben genannten Nachteile der Diagnose von biologisch aktivem h-PTH beseitigt werden können.

Das angesprochene technische Problem wird überraschenderweise gelöst durch Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37) enthaltend  $\alpha$ -helicale Aminosäuresequenzbereiche und/oder nicht strukturierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die Peptide bei Injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen. Dabei enthalten die Peptide vorzugsweise die N-terminale  $\alpha$ -Helix im Bereich der Aminosäuren 5-9, einen unstrukturierten Abschnitt der Aminosäuren 10-16 und/oder eine C-terminale  $\alpha$ -Helix im Bereich der Aminosäuresequenz 17-34 des hPTH (1-37). Vorzugsweise werden die folgenden erfindungsgemäßen Peptide zur Immunisierung verwendet:

- hPTH 1-10  $\text{NH}_2$ -Ser<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Glu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Met<sup>8</sup>-His<sup>9</sup>-Asn<sup>10</sup>-OH (1)  
hPTH 1-9  $\text{NH}_2$ -Ser<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Glu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Met<sup>8</sup>-His<sup>9</sup>-OH (2)  
hPTH 1-8  $\text{NH}_2$ -Ser<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Glu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Met<sup>8</sup>-OH (3)  
hPTH 1-7  $\text{NH}_2$ -Ser<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Glu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-OH (4)  
hPTH 1-6  $\text{NH}_2$ -Ser<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Glu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-OH (5)  
hPTH 1-5  $\text{NH}_2$ -Ser<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Glu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-OH (6)  
hPTH 9-18  $\text{NH}_2$ -His<sup>9</sup>-Asn<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Ser<sup>17</sup>-Met<sup>18</sup>-OH (7)  
hPTH 10-18  $\text{NH}_2$ -Asn<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Ser<sup>17</sup>-Met<sup>18</sup>-OH (8)  
hPTH 11-18  $\text{NH}_2$ -Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Ser<sup>17</sup>-Met<sup>18</sup>-OH (9)  
hPTH 12-18  $\text{NH}_2$ -Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Ser<sup>17</sup>-Met<sup>18</sup>-OH (10)  
hPTH 13-18  $\text{NH}_2$ -Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Ser<sup>17</sup>-Met<sup>18</sup>-OH (11)  
hPTH 14-18  $\text{NH}_2$ -His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Ser<sup>17</sup>-Met<sup>18</sup>-OH (12)  
hPTH 9-17  $\text{NH}_2$ -His<sup>9</sup>-Asn<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Ser<sup>17</sup>-OH (13)  
hPTH 9-16  $\text{NH}_2$ -His<sup>9</sup>-Asn<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-OH (14)  
hPTH 9-15  $\text{NH}_2$ -His<sup>9</sup>-Asn<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-OH (15)  
hPTH 9-14  $\text{NH}_2$ -His<sup>9</sup>-Asn<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-OH (16)  
hPTH 9-13  $\text{NH}_2$ -His<sup>9</sup>-Asn<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-OH (17)  
hPTH 24-37  
 $\text{NH}_2$ -Leu<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (18)  
hPTH 25-37  
 $\text{NH}_2$ -Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (19)  
hPTH 26-37  
 $\text{NH}_2$ -Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (20)  
hPTH 27-37  
 $\text{NH}_2$ -Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (21)

hPTH 28-37 NH <sub>2</sub> —Leu <sup>28</sup> —Gln <sup>29</sup> —Asp <sup>30</sup> —Val <sup>31</sup> —His <sup>32</sup> —Asn <sup>33</sup> —Phe <sup>34</sup> —Val <sup>35</sup> —Ala <sup>36</sup> —Leu <sup>37</sup> —OH	(22)	
hPTH 29-37 NH <sub>2</sub> —Gln <sup>29</sup> —Asp <sup>30</sup> —Val <sup>31</sup> —His <sup>32</sup> —Asn <sup>33</sup> —Phe <sup>34</sup> —Val <sup>35</sup> —Ala <sup>36</sup> —Leu <sup>37</sup> —OH	(23)	
hPTH 30-37 NH <sub>2</sub> —Asp <sup>30</sup> —Val <sup>31</sup> —His <sup>32</sup> —Asn <sup>33</sup> —Phe <sup>34</sup> —Val <sup>35</sup> —Ala <sup>36</sup> —Leu <sup>37</sup> —OH	(24)	
hPTH 31-37 NH <sub>2</sub> —Val <sup>31</sup> —His <sup>32</sup> —Asn <sup>33</sup> —Phe <sup>34</sup> —Val <sup>35</sup> —Ala <sup>36</sup> —Leu <sup>37</sup> —OH	(25)	
hPTH 32-37 NH <sub>2</sub> —His <sup>32</sup> —Asn <sup>33</sup> —Phe <sup>34</sup> —Val <sup>35</sup> —Ala <sup>36</sup> —Leu <sup>37</sup> —OH	(26)	5
hPTH 33-37 NH <sub>2</sub> —Asn <sup>33</sup> —Phe <sup>34</sup> —Val <sup>35</sup> —Ala <sup>36</sup> —Leu <sup>37</sup> —OH	(27)	
hPTH NH <sub>2</sub> —Leu <sup>24</sup> —Arg <sup>25</sup> —Lys <sup>26</sup> —Lys <sup>27</sup> —Leu <sup>28</sup> —Gln <sup>29</sup> —Asp <sup>30</sup> —Val <sup>31</sup> —His <sup>32</sup> —Asn <sup>33</sup> —Phe <sup>34</sup> —Val <sup>35</sup> —Ala <sup>36</sup> —OH	(28)	24-36
hPTH NH <sub>2</sub> —Leu <sup>24</sup> —Arg <sup>25</sup> —Lys <sup>26</sup> —Lys <sup>27</sup> —Leu <sup>28</sup> —Gln <sup>29</sup> —Asp <sup>30</sup> —Val <sup>31</sup> —His <sup>32</sup> —Asn <sup>33</sup> —Phe <sup>34</sup> —Val <sup>35</sup> —OH	(29)	24-35 10
hPTH NH <sub>2</sub> —Leu <sup>24</sup> —Arg <sup>25</sup> —Lys <sup>26</sup> —Lys <sup>27</sup> —Leu <sup>28</sup> —Gln <sup>29</sup> —Asp <sup>30</sup> —Val <sup>31</sup> —His <sup>32</sup> —Asn <sup>33</sup> —Phe <sup>34</sup> —OH	(30)	24-34
hPTH 24-33 NH <sub>2</sub> —Leu <sup>24</sup> —Arg <sup>25</sup> —Lys <sup>26</sup> —Lys <sup>27</sup> —Leu <sup>28</sup> —Gln <sup>29</sup> —Asp <sup>30</sup> —Val <sup>31</sup> —His <sup>32</sup> —Asn <sup>33</sup> —OH	(31)	
hPTH 24-32 NH <sub>2</sub> —Leu <sup>24</sup> —Arg <sup>25</sup> —Lys <sup>26</sup> —Lys <sup>27</sup> —Leu <sup>28</sup> —Gln <sup>29</sup> —Asp <sup>30</sup> —Val <sup>31</sup> —His <sup>32</sup> —OH	(32)	15
hPTH 24-31 NH <sub>2</sub> —Leu <sup>24</sup> —Arg <sup>25</sup> —Lys <sup>26</sup> —Lys <sup>27</sup> —Leu <sup>28</sup> —Gln <sup>29</sup> —Asp <sup>30</sup> —Val <sup>31</sup> —OH	(33)	
hPTH 24-30 NH <sub>2</sub> —Leu <sup>24</sup> —Arg <sup>25</sup> —Lys <sup>26</sup> —Lys <sup>27</sup> —Leu <sup>28</sup> —Gln <sup>29</sup> —Asp <sup>30</sup> —OH	(34)	
hPTH 24-29 NH <sub>2</sub> —Leu <sup>24</sup> —Arg <sup>25</sup> —Lys <sup>26</sup> —Lys <sup>27</sup> —Leu <sup>28</sup> —Gln <sup>29</sup> —OH	(35)	
hPTH 24-28 NH <sub>2</sub> —Leu <sup>24</sup> —Arg <sup>25</sup> —Lys <sup>26</sup> —Lys <sup>27</sup> —Leu <sup>28</sup> —OH	(36)	20

Die genannten Sequenzen repräsentieren in ihrer Primärstruktur wesentliche Merkmale der Sekundärstruktur, wie sich durch NMR-Daten unterstützend belegen läßt. Voraussetzung dazu war eine Festlegung der Sekundärstruktur für PTH 1-37 in physiologischer Lösung.

Die genannten strukturell auffälligen Bereiche wirken gut immunogen. Es werden Antikörper gebildet, die an den ersten Aminosäuren des N-Terminus binden. Bereits das Fehlen von zwei Aminosäuren führt zu einem erheblichen Affinitätsverlust. Da diese Aminosäuren zur Ausübung der biologischen Wirkung unerlässlich sind, ist es mit dem erfindungsgemäßen Peptid möglich Antikörper zu erhalten, die nur hPTH und Fragmente davon erkennen, die biologisch aktiv sind.

Weiterhin sind Antikörper herstellbar, die den midregionalen Bereich 9—15 detektieren, und Antikörper die L-terminal im Bereich der Aminosäuren 30—37 binden. Erfindungsgemäß können also Antikörper gegen Bereiche des hPTH 1-37 produziert werden, die aufgrund theoretischer Berechnungen im Gesamtmolekül nicht immunogen wirken. Diese Bereiche liegen zudem soweit auseinander, daß keine sterische Hinderung vorliegt, die ein gleichzeitiges Binden zweier Antikörper verhindern würde.

Die Peptide können in bevorzugten Ausführungsformen am N-terminalen Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen Ende modifiziert sein, und zwar in Form von Acetylierungs-, Amidierungs-, Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungsprodukten.

Schließlich können erfindungsgemäße Peptide auch an Carrierproteine wie Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalalbumin oder Mausserumalbumin etc. gebunden sein. Die Bindung an die Carrierproteine erfolgt vorzugsweise durch Carbodiimid oder Formaldehyd.

Die erfindungsgemäßen Peptide können verwendet werden, um ein Diagnostikum herzustellen. Das erfindungsgemäße Diagnostikum ist dabei erhältlich durch an sich bekannte Immunisierung von Tieren mit mindestens einem der erfindungsgemäßen Peptide. Nach der Immunisierung kann aus den immunisierten Tieren eine Immunglobulin-Fraktion isoliert werden, die Antikörper-Fractionen enthält, welche einen Antikörper-Titer gegen mindestens eines der erfindungsgemäßen Peptide aufweisen. Die so erhaltenen Antikörpern sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. In einer alternativen Ausführungsform können neben den vollständigen Antikörpern bestehend aus F<sub>ab</sub> und F<sub>c</sub> auch deren Fragmente wie F<sub>ab</sub> oder Fragmente der Antikörper verwendet werden, welche die Idiotypen zu den Epitopen der Peptide sind.

Die Peptide gemäß der Erfindung sind zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktiven h-PTH (1-37) geeignet.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben:

#### Beispiel 1

#### Festphasensynthese der Peptide

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Synthese der Peptide beruht auf der Peptidsynthese am festen Träger. Die C-terminale Aminosäure wird jeweils in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid und Dimethylaminopyridin an das Trägermaterial gebunden. Als Trägermaterial für die Synthesen werden Wang-Harz oder entsprechende Harze eingesetzt.

Folgende L-Aminosäure-Derivate werden für die Synthese der Sequenz, ausgehend vom aufgeführten Peptidyl-Harz, verwendet: a) hPTH 1-10: Fmoc—Asn(Trt)—Wang-Harz, Fmoc—His(Trt)—OH, Fmoc—Met—OH, Fmoc—Leu—OH, Fmoc—Gln(Trt)—OH, Fmoc—Ile—OH, Fmoc—Glu(OtBu)—OH, Fmoc—Ser(tBu)—OH, Fmoc—Val—OH, Bocser(tBu)—OH. b) hPTH 9-18: Fmoc—Met—Wang-Harz, Fmoc—Ser(tBu)—OH, Fmoc—Asn(Trt)—OH, Fmoc—Leu—OH, Fmoc—His(Trt)—OH, Fmoc—Lys(Boc)—OH, Fmoc—Gly—OH, Fmoc—Leu—OH, Fmoc—Asn(Trt)—OH, Boc—His(Trt)—OH. c) hPTH 24-37: Fmoc—Leu—Wang-Harz, Fmoc—Ala—OH, Fmoc—Val—OH, Fmoc—Phe—OH, Fmoc—Asn(Trt)—OH, Fmoc—His(Trt)—OH, Fmoc—Val—OH, Fmoc—Asp(OtBu)—OH, Fmoc—Gln(Trt)—OH, Fmoc—Leu—OH, Fmoc—Lys(Boc)—OH, Fmoc—Lys(Boc)—OH, Fmoc—Arg(Pmc)—OH, Fmoc—Leu—OH.

Die Synthese kann durch in situ-Aktivierung mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorborat (TBTU) oder dessen Derivaten oder mit Benzotriazol-1-yl-oxytris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) oder dessen Derivaten in Gegenwart von Diisopropylethylamin oder N-Methylmorpholin und 1-Hydroxybenzotriazol durchgeführt werden, wobei während der Kupplungen in N,N-Dimethylformamid, N,N-Dimethylacetamid oder N-Methylpyrrolidon ein vier- bis zehnfacher Überschuß der Fmoc-L-Aminosäure verwendet wird. Die Abspaltungen der Fmoc-Gruppen werden mit 20% Piperidin oder 2% Piperidin und 2% 1,8-Diazbicyclo[5,4,0]undec-7-en (DBU) in N,N-Dimethylformamid, N,N-Dimethylacetamid oder N-Methylpyrrolidon durchgeführt. Nach der Synthese werden die Harze mit 2-Propanol und Dichlormethan gewaschen und im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Zur Abspaltung vom Träger und Entblockierung wird das Peptidyl-Harz 30–90 Minuten bei Raumtemperatur mit Trifluoressigsäure, die 5% Scavenger, Wasser, Ethandiol, Phenol oder Thioanisol, enthält, umgesetzt, filtriert, mit Trifluoressigsäure gewaschen und anschließend mit tert-Butylmethylether ausgefällt. Der Niederschlag wird aus wäßriger Lösung lyophilisiert.

#### Beispiel 2

##### Reinigung und Analyse

Die Reinigung der Rohprodukte erfolgt chromatographisch über eine C18-Reverse-Phase-Säule (10 µm, Puffer A: 0,01 N HCl in Wasser; Puffer B: 20% Isopropanol, 30% Methanol, 50% Wasser, 0,01 N HCl; Gradient: 10–80% in 60 Minuten; Detektion 230 nm).

Reinheit der Produkte werden durch Massenspektrometrie und C18-Reverse-Phase-Chromatographie bestimmt.

#### Beispiel 3

##### Kopplung an Carrierprotein

Als Carrierprotein werden Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalbumin oder Mausserumalbumin verwendet. Die Kopplung erfolgt nach der Carbodiimid Methode über Carboxylgruppen des Peptides. Das Peptid wird in wäßriger Lösung durch 5 minütige Umsetzung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid Hydrochlorid aktiviert. Die Kopplung erfolgt durch Zugabe des aktivierten Peptides zu einer wäßrigen Lösung des Carriers. Das molare Verhältnis beträgt 1 Peptid auf 50 Aminosäuren des Carrierproteins. Die Umsetzung dauert 4 Stunden.

Die Reaktion wird durch Zugabe von Natriumacetat in einer Endkonzentration von 100 mM gestoppt. Man läßt eine Stunde inkubieren.

Die Abtrennung des Protein-Peptid Konjugates vom Peptid erfolgt durch wiederholte Dialyse gegen 100 mM Phosphatpuffer pH 7,2.

#### Beispiel 4

##### Synthese der Multiple Antigenic Peptides (MAP)

Die dreifache Lysin-Verzweigung wird erreicht, indem an C-terminales Alanin, gebunden an Wang-Harz, in drei Kupplungszyklen jeweils Fmoc-L-Lysin(Fmoc)-OH gebunden wird. Durch Abspaltung mit Piperidin werden danach acht freie Aminofunktionen erhalten, an denen die Sequenzen des humanen Parathormons nach obiger Beschreibung synthetisiert werden.

#### Beispiel 5

##### Immunisierung

Für die Erstimmunisierung werden pro kg Körpergewicht des zu immunisierenden Tieres 125 µg des Carrier-Peptid Konjugates bzw. MAP in 250 ml Wasser gelöst und mit 250 µl kompletten Freund'schen Adjuvans emulgiert. Die Emulsion wird über den Rücken verteilt in 10 Portionen s.c. appliziert.

Das Boostern erfolgt nach 2–4 Wochen analog. Hierbei wird lediglich das komplette Freund'sche Adjuvans durch inkomplettes Freund'sches Adjuvans ersetzt.

##### Patentansprüche

1. Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37) enthaltend α-helicale Aminosäuresequenzbereiche und/oder nicht strukturierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die Peptide bei Injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen.

2. Peptide nach Anspruch 1 aus hPTH (1-37) mit der Sequenz

hPTH 1-10 NH<sub>2</sub>–Ser<sup>1</sup>–Val<sup>2</sup>–Ser<sup>3</sup>–Glu<sup>4</sup>–Ile<sup>5</sup>–Gln<sup>6</sup>–Leu<sup>7</sup>–Met<sup>8</sup>–His<sup>9</sup>–Asn<sup>10</sup>–OH (1)

hPTH 1-9 NH<sub>2</sub>–Ser<sup>1</sup>–Val<sup>2</sup>–Ser<sup>3</sup>–Glu<sup>4</sup>–Ile<sup>5</sup>–Gln<sup>6</sup>–Leu<sup>7</sup>–Met<sup>8</sup>–His<sup>9</sup>–OH (2)

hPTH 1-8 NH<sub>2</sub>–Ser<sup>1</sup>–Val<sup>2</sup>–Ser<sup>3</sup>–Glu<sup>4</sup>–Ile<sup>5</sup>–Gln<sup>6</sup>–Leu<sup>7</sup>–Met<sup>8</sup>–OH (3)

hPTH 1-7	NH <sub>2</sub> -Ser <sup>1</sup> -Val <sup>2</sup> -Ser <sup>3</sup> -Glu <sup>4</sup> -Ile <sup>5</sup> -Gln <sup>6</sup> -Leu <sup>7</sup> -OH	(4)	
hPTH 1-6	NH <sub>2</sub> -Ser <sup>1</sup> -Val <sup>2</sup> -Ser <sup>3</sup> -Glu <sup>4</sup> -Ile <sup>5</sup> -Gln <sup>6</sup> -OH	(5)	
hPTH 1-5	NH <sub>2</sub> -Ser <sup>1</sup> -Val <sup>2</sup> -Ser <sup>3</sup> -Glu <sup>4</sup> -Ile <sup>5</sup> -OH	(6)	
hPTH 9-18	NH <sub>2</sub> -His <sup>9</sup> -Asn <sup>10</sup> -Leu <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Lys <sup>13</sup> -His <sup>14</sup> -Leu <sup>15</sup> -Asn <sup>16</sup> -Ser <sup>17</sup> -Met <sup>18</sup> -OH	(7)	5
hPTH 10-18	NH <sub>2</sub> -Asn <sup>10</sup> -Leu <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Lys <sup>13</sup> -His <sup>14</sup> -Leu <sup>15</sup> -Asn <sup>16</sup> -Ser <sup>17</sup> -Met <sup>18</sup> -OH	(8)	
hPTH 11-18	NH <sub>2</sub> -Leu <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Lys <sup>13</sup> -His <sup>14</sup> -Leu <sup>15</sup> -Asn <sup>16</sup> -Ser <sup>17</sup> -Met <sup>18</sup> -OH	(9)	
hPTH 12-18	NH <sub>2</sub> -Gly <sup>12</sup> -Lys <sup>13</sup> -His <sup>14</sup> -Leu <sup>15</sup> -Asn <sup>16</sup> -Ser <sup>17</sup> -Met <sup>18</sup> -OH	(10)	
hPTH 13-18	NH <sub>2</sub> -Lys <sup>13</sup> -His <sup>14</sup> -Leu <sup>15</sup> -Asn <sup>16</sup> -Ser <sup>17</sup> -Met <sup>18</sup> -OH	(11)	
hPTH 14-18	NH <sub>2</sub> -His <sup>14</sup> -Leu <sup>15</sup> -Asn <sup>16</sup> -Ser <sup>17</sup> -Met <sup>18</sup> -OH	(12)	
hPTH 9-17	NH <sub>2</sub> -His <sup>9</sup> -Asn <sup>10</sup> -Leu <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Lys <sup>13</sup> -His <sup>14</sup> -Leu <sup>15</sup> -Asn <sup>16</sup> -Ser <sup>17</sup> -OH	(13)	10
hPTH 9-16	NH <sub>2</sub> -His <sup>9</sup> -Asn <sup>10</sup> -Leu <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Lys <sup>13</sup> -His <sup>14</sup> -Leu <sup>15</sup> -Asn <sup>16</sup> -OH	(14)	
hPTH 9-15	NH <sub>2</sub> -His <sup>9</sup> -Asn <sup>10</sup> -Leu <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Lys <sup>13</sup> -His <sup>14</sup> -Leu <sup>15</sup> -OH	(15)	
hPTH 9-14	NH <sub>2</sub> -His <sup>9</sup> -Asn <sup>10</sup> -Leu <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Lys <sup>13</sup> -His <sup>14</sup> -OH	(16)	
hPTH 9-13	TH <sub>2</sub> -His <sup>9</sup> -Asn <sup>10</sup> -Leu <sup>11</sup> -Gly <sup>12</sup> -Lys <sup>13</sup> -OH	(17)	
hPTH	NH <sub>2</sub> -Leu <sup>24</sup> -Arg <sup>25</sup> -Lys <sup>26</sup> -Lys <sup>27</sup> -Leu <sup>28</sup> -Gln <sup>29</sup> -Asp <sup>30</sup> -Val <sup>31</sup> -His <sup>32</sup> -Asn <sup>33</sup> -Phe <sup>34</sup> -Val <sup>35</sup> -Ala <sup>36</sup> -Leu <sup>37</sup> -OH	(18)	24-37 15
hPTH	NH <sub>2</sub> -Arg <sup>25</sup> -Lys <sup>26</sup> -Lys <sup>27</sup> -Leu <sup>28</sup> -Gln <sup>29</sup> -Asp <sup>30</sup> -Val <sup>31</sup> -His <sup>32</sup> -Asn <sup>33</sup> -Phe <sup>34</sup> -Val <sup>35</sup> -Ala <sup>36</sup> -Leu <sup>37</sup> -OH	(19)	25-37 20
hPTH	NH <sub>2</sub> -Lys <sup>26</sup> -Lys <sup>27</sup> -Leu <sup>28</sup> -Gln <sup>29</sup> -Asp <sup>30</sup> -Val <sup>31</sup> -His <sup>32</sup> -Asn <sup>33</sup> -Phe <sup>34</sup> -Val <sup>35</sup> -Ala <sup>36</sup> -Leu <sup>37</sup> -OH	(20)	26-37 25
hPTH	NH <sub>2</sub> -Lys <sup>27</sup> -Leu <sup>28</sup> -Gln <sup>29</sup> -Asp <sup>30</sup> -Val <sup>31</sup> -His <sup>32</sup> -Asn <sup>33</sup> -Phe <sup>34</sup> -Val <sup>35</sup> -Ala <sup>36</sup> -Leu <sup>37</sup> -OH	(21)	27-37 28-37
hPTH	NH <sub>2</sub> -Leu <sup>28</sup> -Gln <sup>29</sup> -Asp <sup>30</sup> -Val <sup>31</sup> -His <sup>32</sup> -Asn <sup>33</sup> -Phe <sup>34</sup> -Val <sup>35</sup> -Ala <sup>36</sup> -Leu <sup>37</sup> -OH	(22)	
hPTH 29-37	NH <sub>2</sub> -Gln <sup>29</sup> -Asp <sup>30</sup> -Val <sup>31</sup> -His <sup>32</sup> -Asn <sup>33</sup> -Phe <sup>34</sup> -Val <sup>35</sup> -Ala <sup>36</sup> -Leu <sup>37</sup> -OH	(23)	
hPTH 30-37	NH <sub>2</sub> -Asp <sup>30</sup> -Val <sup>31</sup> -His <sup>32</sup> -Asn <sup>33</sup> -Phe <sup>34</sup> -Val <sup>35</sup> -Ala <sup>36</sup> -Leu <sup>37</sup> -OH	(24)	
hPTH 31-37	NH <sub>2</sub> -Val <sup>31</sup> -His <sup>32</sup> -Asn <sup>33</sup> -Phe <sup>34</sup> -Val <sup>35</sup> -Ala <sup>36</sup> -Leu <sup>37</sup> -OH	(25)	30
hPTH 32-37	NH <sub>2</sub> -His <sup>32</sup> -Asn <sup>33</sup> -Phe <sup>34</sup> -Val <sup>35</sup> -Ala <sup>36</sup> -Leu <sup>37</sup> -OH	(26)	
hPTH 33-37	NH <sub>2</sub> -Asn <sup>33</sup> -Phe <sup>34</sup> -Val <sup>35</sup> -Ala <sup>36</sup> -Leu <sup>37</sup> -OH	(27)	
hPTH	NH <sub>2</sub> -Leu <sup>24</sup> -Arg <sup>25</sup> -Lys <sup>26</sup> -Lys <sup>27</sup> -Leu <sup>28</sup> -Gln <sup>29</sup> -Asp <sup>30</sup> -Val <sup>31</sup> -His <sup>32</sup> -Asn <sup>33</sup> -Phe <sup>34</sup> -Val <sup>35</sup> -Ala <sup>36</sup> -OH	(28)	24-36 35
hPTH	NH <sub>2</sub> -Leu <sup>24</sup> -Arg <sup>25</sup> -Lys <sup>26</sup> -Lys <sup>27</sup> -Leu <sup>28</sup> -Gln <sup>29</sup> -Asp <sup>30</sup> -Val <sup>31</sup> -His <sup>32</sup> -Asn <sup>33</sup> -Phe <sup>34</sup> -Val <sup>35</sup> -OH	(29)	24-35
hPTH	NH <sub>2</sub> -Leu <sup>24</sup> -Arg <sup>25</sup> -Lys <sup>26</sup> -Lys <sup>27</sup> -Leu <sup>28</sup> -Gln <sup>29</sup> -Asp <sup>30</sup> -Val <sup>31</sup> -His <sup>32</sup> -Asn <sup>33</sup> -Phe <sup>34</sup> -OH	(30)	24-34 40
hPTH	NH <sub>2</sub> -Leu <sup>24</sup> -Arg <sup>25</sup> -Lys <sup>26</sup> -Lys <sup>27</sup> -Leu <sup>28</sup> -Gln <sup>29</sup> -Asp <sup>30</sup> -Val <sup>31</sup> -His <sup>32</sup> -Asn <sup>33</sup> -OH	(31)	24-33
hPTH 24-32	NH <sub>2</sub> -Leu <sup>24</sup> -Arg <sup>25</sup> -Lys <sup>26</sup> -Lys <sup>27</sup> -Leu <sup>28</sup> -Gln <sup>29</sup> -Asp <sup>30</sup> -Val <sup>31</sup> -His <sup>32</sup> -OH	(32)	
hPTH 24-31	NH <sub>2</sub> -Leu <sup>24</sup> -Arg <sup>25</sup> -Lys <sup>26</sup> -Lys <sup>27</sup> -Leu <sup>28</sup> -Gln <sup>29</sup> -Asp <sup>30</sup> -Val <sup>31</sup> -OH	(33)	
hPTH 24-30	NH <sub>2</sub> -Leu <sup>24</sup> -Arg <sup>25</sup> -Lys <sup>26</sup> -Lys <sup>27</sup> -Leu <sup>28</sup> -Gln <sup>29</sup> -Asp <sup>30</sup> -OH	(34)	45
hPTH 24-29	NH <sub>2</sub> -Leu <sup>24</sup> -Arg <sup>25</sup> -Lys <sup>26</sup> -Lys <sup>27</sup> -Leu <sup>28</sup> -Gln <sup>29</sup> -OH	(35)	
hPTH 24-28	NH <sub>2</sub> -Leu <sup>24</sup> -Arg <sup>25</sup> -Lys <sup>26</sup> -Lys <sup>27</sup> -Leu <sup>28</sup> -OH	(36)	

3. Peptide nach Anspruch 1 und/oder 2, die am N-terminalen Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen Ende modifiziert sind in Form von Acetylierungs-, Amidierungs-Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungsprodukten, und/oder gebunden sind an Carrierproteine wie Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalalbumin oder Mausserumalbumin. 50

4. Diagnostikum, erhältlich durch an sich bekannte Immunisierung von Tieren mit mindestens einem der Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, Gewinnung von Immunoglobulinen enthaltenden Fraktionen aus den immunisierten Tieren und Isolierung von Fraktionen, die einen Antikörper-Titer gegen mindestens eines der Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 aufweisen und das gegebenenfalls weiter Hilfs- und/oder Trägerstoffe enthält. 55

5. Antikörper oder Fragmente von Antikörpern erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit mindestens einem Peptid nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3. 60

6. Verwendung der Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktiven h-PTH (1-37). 65

- Leerseite -

19. **Federal Republic of Germany**  
**German Patent Office**

51. Int. Cl.<sup>6</sup>: C 07 K 14/635

12. Disclosure Document  
11. DE 44 34 551 A 1

DE 44 34 551 A1

21. File No.: P 44 34 551.8  
22. Date of Application: 9/28/94  
43. Date of Disclosure: 4/4/96

---

73. Patent Holder:  
Forssmann, Wolf-Georg, Prof., Dr.Dr.,  
30175 Hannover, Germany

72. Inventor:  
Adermann, Knut, Dr., 30177  
Hannover, Germany  
Forssmann, Wolf-Georg,  
Prof. Dr.Dr., 30175  
Hannover, Germany  
Hock, Dieter, Dr., 74924  
Neckarsbischofsheim, Germany  
Mägerlein, Markus, 63785  
Obernburg, Germany

74. Agent:  
Godemeyer, T., Dr.rer.nat.,  
Patent Attorney 51491 Overath

---

Examination application filed pursuant to § 44, PatG [Patent Law].

54. Peptides from the hPTH Sequence (1-37)

57. The invention relates to peptides from the human parathyroid (hPTH) sequence (1-37), containing  $\alpha$ -helical amino acid sequence regions and/or unstructured amino acid sequence regions, where said peptides are capable of inducing antibodies when injected into animals. The invention also relates to a diagnostic agent and antibodies obtainable by vaccination of animals with the peptides in question.

DE 197 33 666 A 1

The following information is taken from documentation  
filed by the Applicant.

**Peptides from the hPTH Sequence (1-37)**

This invention relates to peptides from the hPTH sequence (1-37), a diagnostic agent obtainable by vaccination of animals with the peptides, antibodies or fragments thereof, that can be obtained by vaccination of animals with the peptides, as well as the use of peptides for production of an agent for diagnosis of biologically active h-PTH.

Human parathyroid hormone (hPTH), a linear polypeptide of 84 amino acids, plays an important role in regulating the calcium metabolism. The metabolism of this hormone leads to a large number of C-terminal fragments whose biological function has not been clarified yet. Human PTH 1-37 has been detected as a circulating N-terminal fragment (EP-A 0 349 545). This fragment possesses the full biological activity of the complete hormone. This decreases substantially, however, upon loss of the first amino acid, serine, and is completely lost upon removal of the first two amino acids, serine and valine.

For the intact hormone, hPTH 1-84, and for the N-terminal fragment, serum concentrations have been measured in the area of  $10^{-12}$  mol/L. Immunological measurement techniques are used to detect such low concentrations. The most valid results are provided by the double-antibody or sandwich principle (e.g., two-site immunoradiometric assay (IRMA), or Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Sandwich ELISA)). These assays for hPTH 1-84 are available commercially. There is no assay for hPTH 1-34 using the double antibody principle.

Two antibodies are required for this. To avoid reciprocal steric hindrance, the method must recognize epitopes of the antigen located at a sufficient distance from each other. Vaccination with intact antigens results in a heterogeneous mixture of various antibodies that have to be purified before the sandwich assay. Of course, detecting a preferred immunoactive sequence in the region of amino acids 7-14 at the N terminus was possible previously based on theoretical calculations according to B.A. Jameson & H., Wolf, "The Antigenic Index: A Novel Algorithm for Predicting Antigenic Determinants", CABIOS 4, pp. 181-186, 1988. Vaccination with N-terminal fragments according to established methods leads, initially, to antibodies that bind in this amino acid region, as described for hPTH 1-34 (J. Tampe, P. Brozio, H.E. Manneck, A. Mißbichler, E. Blind, K.B. Müller, H. Schmidt-Gayk and F.P. Armbruster; "Characterization of Antibodies Against Human N-Terminal Parathyroid Hormone by Epitope Mapping"; J. Immunoassay 13, pp. 1-13, 1992). However, these antibodies cannot distinguish between biologically-active and biologically-inactive PTH 1-84 or fragments thereof missing the first two amino acids, serine and valine.

The problem to which the invention relates consists of specifying peptides that can help to eliminate the above disadvantages in diagnosing biologically-active h-PTH.

The technical problem discussed is solved surprisingly by peptides from the hPTH sequence (1-37) containing  $\alpha$ -helical amino acid sequence regions and/or unstructured amino acid sequence regions, where vaccination of animals with the peptides can induce antibodies. The peptides here preferably contain the N terminal  $\alpha$  helix in the region of amino acids 5-9, an unstructured section of amino acids 10-16 and/or a C terminal  $\alpha$  helix in the region of amino acid sequence 17-34 of the hPTH (1-37). The following peptides according to the invention are preferably used for the vaccination:





The primary structures of the above sequences represent essential characteristics of the secondary structure, as supported by the NMR data. A precondition for this was determining the secondary structure of PTH 1-37 in saline solution.

The structurally-remarkable regions cited have good immunogenic activity. Antibodies are formed that bind to the first amino acids of the N terminus. The lack of two amino acids already leads to a substantial loss of affinity. Since these amino acids are essential to biological activity, it is possible to obtain antibodies with the peptides according to the invention that recognize only hPTH and fragments thereof that are biologically active.

Furthermore, antibodies can be produced that detect the mid-region areas 9-15, and antibodies that bind the L terminal in the region of amino acids 30-37. According to the invention, therefore, antibodies can be produced against regions of hPTH 1-37 that do not have immunogenic effects based on theoretical calculations in the intact molecule. These regions are also located at such a distance from each other that there is no steric hindrance that would hinder the simultaneous binding of two antibodies.

In the preferred embodiment, the peptides can be modified at the N terminal end, the side chains and/or at the C terminal end, by acetylation, amidation, phosphorylation and/or glycosylation products.

Finally, peptides according to the invention can also be bound to carrier proteins such as hemocyanin, thyroglobulin, bovine serum albumin, ovalbumin or mouse serum albumin. They are preferably bound with the carrier protein through carbodiimide or formaldehyde.

The peptides according to the invention can be used to produce a diagnostic agent. The diagnostic agent according to the invention can be obtained by known vaccination of animals with at least one of the peptides according to the invention. After vaccination, an immunoglobulin fraction can be isolated from the vaccinated animals; the fraction contains antibody fractions that have an antibody titer against at least one of the peptides according to the invention. The antibodies thus obtained are also the subject of this invention. In an alternative embodiment, in addition to the complete antibodies consisting of  $F_{ab}$  and  $F_c$ , fragments thereof, such as  $F_{ab}$ , or fragments of antibodies are used; they are the idiotypes for the epitopes of the peptides.

The peptides according to the invention are suitable for production of an agent for diagnosing biologically-active h-PTH (1-37).

The invention is described in greater detail based on the following examples:

#### Example 1

##### Solid Phase Peptide Synthesis

The process for synthesis of peptides according to the invention is based on peptide synthesis on solid carriers. The C terminal amino acids are bound to the carrier material in the presence of dicyclohexylcarbodiimide and dimethylaminopyridine. The carrier material used for the synthesis is Wang resin or similar resins.

The following L-amino acid derivatives are used for the synthesis of the sequence, starting with the specified peptidyl resin: a) hPTH 1-10: Fmoc-Asn(Trt)-Wang resin, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Boc-Arg(tBu)-OH. b) hPTH 9-18: Fmoc-Met-Wang resin, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Boc-His(Trt)-OH. c) hPTH 24-37: Fmoc-Leu-Wang resin, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Leu-OH.

The synthesis can be carried out through in-situ activation with 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU) or derivatives thereof, or with benzotriazol-1-yloxy-(trisdimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) or derivatives thereof, in the presence of diisopropyl ethylamine or N-methylmorpholine and 1-hydroxybenzotriazole, where a four- to ten-fold excess of Fmoc-L-amino acid is used during the couplings in N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide or N-methylpyrrolidone. The Fmoc groups are dissociated with 20% piperidine or 2% piperidine and 2% 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) in N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide or N-methylpyrrolidone. After synthesis, the resin is washed with 2-propanol and dichloromethane and dried to a constant weight under a high vacuum.

For dissociation from the carrier and unblocking, the peptidyl resin is treated for 30 – 90 minutes at ambient temperature with trifluoroacetic acid containing 5% scavenger, water, ethanediol, phenol or thioanisole, then filtered, washed with trifluoroacetic acid and finally precipitated with tert-butyl methyl ether. The precipitate is lyophilized out of an aqueous solution.

### Example 2

#### Purification and Analysis

The raw product is purified by chromatography in a C-18 reverse phase column (10  $\mu$ m, Buffer A: 0.01 N HCl in water; Buffer B: 20% isopropanol, 30% methanol, 50% water, 0.01 N HCl; gradient: 10 – 80% in 60 minutes; detection 230 nm).

The purity of the product is determined by mass spectrometry and C18 reverse phase chromatography.

### Example 3

#### Coupling to Carrier Protein

Hemocyanin, thyroglobulin, bovine serum albumin, ovalbumin or mouse serum albumin is used as a carrier protein. The coupling takes place according to the carbodiimide method, via the carboxyl groups of the peptide. The peptide is activated by a 5-minute treatment in an aqueous solution with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride. Coupling occurs by the addition of the activated peptide to an aqueous solution of the carrier. The molar ratio is 1 peptide to 50 amino acids of the carrier protein. The treatment takes 4 hours.

The reaction is stopped by addition of sodium acetate in a final concentration of 100 mM. Incubate for 1 hour.

The protein-peptide conjugate is separated from the peptide by repeated dialysis over 100 mM of phosphate buffer, pH 7.2

### Example 4

#### Synthesis of Multiple Antigenic Peptides (MAP)

The triple lysine branch is achieved by binding Fmoc-L-lysine(Fmoc)-OH to C terminal alanine, bound to Wang resin, in three coupling cycles. Eight free amino functions are obtained by dissociation with piperidine; the sequences of human parathyroid hormone are synthesized at those functions according to the description above.

### Example 5

#### Vaccination

125  $\mu$ g of the carrier-peptide conjugate or MAP, dissolved in 250 ml water and emulsified with 250  $\mu$ l of complete Freund's adjuvant, is used per kg of body weight for the first vaccination. The emulsion is applied to the back in 10 separate SC injections.

Boosters are given similarly after 2-4 weeks. However, the complete Freund's adjuvant is replaced with incomplete Freund's adjuvant here.

### Patent Claims

We claim:

1. A peptide from the hPTH sequence (1-37) containing  $\alpha$ -helical amino acid sequence regions and/or unstructured amino acid sequence regions, wherein the peptides can induce antibodies upon injection into animals.
2. Peptides according to Claim 1, from hPTH (1-37), with the sequence:



3. Peptides according to Claim 1 and/or 2, modified at the N-terminal end, the side chains and/or the C-terminal end with acetylation, amidation, phosphorylation and/or glycosylation products, and/or bound to carrier proteins such as hemocyanin, thyroglobulin, bovine serum albumin, ovalbumin or mouse serum albumin.
4. A diagnostic agent obtainable by vaccination, known *per se*, of animals with at least one of the peptides according to at least one of the Claims 1 through 3, by obtaining fractions containing immunoglobulins from the vaccinated animals and by isolating fractions with an antibody titer against at least one of the peptides according to at least one of Claims 1 through 3 and that contains, if necessary, other adjuvants and/or carriers.
5. Antibody or fragments of antibodies obtained by vaccination of animals with at least one peptide according to at least one of Claims 1 through 3.
6. Use of the peptides according to at least one of Claims 1 through 3 for production of an agent for diagnosis of biologically-active h-PTH (1-37).

DE 44 34 551 A1

- Blank Page -

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**